分枝杆菌细胞裂解液催化甾体激素 $C_{1,2}$ 位脱氢反应的研究

秦梦菲，孙鸿，宋浩*

（天津大学化工学院，系统生物工程教育部重点实验室，天津化学化工协同创新中心合成生物学平台，天津，300072）

摘要 9β,11β-环氧-17α,21-二羟基-16β-甲基孕-1,4-二烯-3,20-二酮（Ⅳ）是生产 9-氟甾体激素的关键前体，以 9β,11β-环氧-17α,21-二羟基-16β-甲基孕-4-烯-3,20-二酮-21-醋酸酯（Ⅰ）为底物合成Ⅳ是工业化生产Ⅳ的重要方法。通过比较分枝杆菌全细胞转化法与细胞裂解液转化法，发现分枝杆菌全细胞只能将Ⅰ转化 9β,11β-环氧-17α,21-二羟基-16β-甲基孕-4-烯-3,20-二酮（Ⅱ），而细胞裂解液可以有效地将Ⅰ转化为Ⅳ，其反应机制为底物Ⅰ自发水解为中间体Ⅱ，Ⅱ在 $C_{1,2}$ 位脱氢酶（KSTD）的催化作用下发生 $C_{1,2}$ 位脱氢反应生成产物Ⅳ。为进一步提高产物Ⅳ的转化率，利用基因工程手段在分枝杆菌中分别过表达编码 KSTD 的关键基因：*kstD*、*kstD*3 和 $kstD_M$，提高脱氢反应效率，结果表明 1 g/L 底物Ⅰ在 pH7.0 的重组菌株 MS136-$kstD_M$ 细胞裂解液中反应 45 h，Ⅳ的转化率为 78.4 %，比出发菌株提高了 38.9%；并优化缓冲液 pH，提高反应速率，结果表明 1 g/L 底物Ⅰ在 pH7.5 的重组菌株 MS136-$kstD_M$ 细胞裂解液中反应 45 h，Ⅳ的转化率为 92.8 %，比出发菌株提高了 63.4 %。

关键词 9β,11β-环氧-17α,21-二羟基-16β-甲基孕-1,4-二烯-3,20-二酮 分枝杆菌细胞裂解液 $C_{1,2}$ 位脱氢酶

Studies on the 3-Ketosteriod-1-Dehydrogenation of Steroid Hormone by Cellular lysates of *Mycobacterium*

QIN Meng-fei, SUN Hong, SONG Hao*

（School of Chemical Engineering and Technology,Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), Tianjin University,Tianjin, China, 300072）

Abstract 9β, 11β-Epoxypregn-4-ene-17α, 21-diol-3, 20-dione 21-acetate (Ⅰ) is a substrate for the production of 9β, 11β-Epoxypregn-1, 4-diene-17α, 21-diol-3, 20-dione (Ⅳ), which is a key precursor for the production of many 9-fluoro-substituted corticosteroid hormones. By comparing whole cells catalysis and cellular lysates conversion, it was found that whole cells of *Mycobacterium* sp. MS136 could only convert Ⅰ to 9β, 11β-Epoxypregn-4-ene-17α, 21-diol-3, 20-dione (Ⅱ), and Ⅰ can be effectively converted to Ⅳ by cellular lysates. The reaction order is that Ⅰ is spontaneously hydrolyzed to Ⅱ and Ⅱ undergoes $C_{1,2}$-dehydrogenation reaction to Ⅳ.In order to improve the productivity of Ⅳ, the key genes *kstD*, *kstD*3 and $kstD_M$ encoding $C_{1,2}$-dehydrogenase (KSTD)were overexpressed in *Mycobacterium* sp. MS136 to enhance the $C_{1,2}$-dehydrogenation reaction rate, and the results showed that 1 g/L substrate Ⅰ can be converted by recombinant strain MS136-$kstD_M$cellular lysates at pH 7.0, the productivity of Ⅳ reached 78.4% after 45 h, which is 38.9% higher than original strain. The reaction rate is enhanced by optimizing the pH, and the results showed that 1 g/L substrate (Ⅰ)can be converted by recombinant strain MS136-$kstD_M$cellular lysates at pH 7.5, the productivity of Ⅳreached92.8%

*国家青年千人基金（SQK13001）
**通讯作者：宋浩，E-mail：hsong@tju.edu.cn

after 45 h, which was 63.4% higher than original strain.
Key words 9β,11β-Epoxypregn-1,4-diene-17α,21-diol-3,20-dionecellular lysates of *Mycobacterium* 3-ketosteriod-1-dehydrogenase

甾体激素药物作为抗生素之后的第二大类药物广泛用于治疗和预防许多疾病[1]，例如消炎，利尿，避孕，促孕，抗雄激素和抗癌剂等[2-3]。甾药的高需求促生了另一重要产业的蓬勃发展—甾药中间体（甾药前体）的提取与制备。微生物法制备甾药前体的工艺因其环境污染小，反应步骤少、产品损失低、收率高等突出优势[4-5]，广泛应用于工业生产[6]。近年来，通过微生物的生物转化对甾体化合物进行脱氢、氧化、羟化及侧链切割等反应而获得多种药物中间体[7-9]。如图 1 所示，Ⅳ是用于生产 9-氟甾体激素（如地塞米松，倍他米松，曲安西龙等）的关键前体[10-11]，以Ⅰ为底物生产Ⅳ的生物转化过程包括水解反应和 $C_{1,2}$ 位脱氢反应，根据反应顺序不同可区分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ和Ⅰ、Ⅲ（9β,11β-环氧-17α,21-二羟基-16β-甲基孕-1,4-二烯-3,20-二酮-21-醋酸酯）、Ⅳ两种可能的反应机制。但是关于 9（11）-环氧甾体生物转化的研究还未见报道，反应机制也没有完全阐明。

分枝杆菌（*Mycobacterium* sp.）是重要的工业菌株，能够利用甾体作为唯一的碳源，将其开环降解为自身提供能量[12-14]。分枝杆菌可以表达 KSTD，Wei 等[15-16]为使植物甾醇降解后的中间体 9-OHAD（9α-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮）大量积累且稳定存在，敲除了编码 KSTD 的关键基因：*kstD*1、*kstD*2、*kstD*3 和 $kstD_M$；Zhang 等[17]为积累 ADD（雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮），从 *Mycobacterium neoaurum* JC-12 获得编码 KSTD 的 *ksdd* 基因并在 *Bacillus subtilis* 168 中表达。目前，对于甾体化合物的生物转化大多都基于基因工程改造的微生物或分离纯化的酶催化[18]。这些方法可以使甾体化合物的转化率有一定的提高，但甾体底物溶解度差[19]、微生物发酵过程染菌[20]以及分离纯化酶的高成本都是制约其工业应用的关键问

题。

本实验以 *Mycobacterium* sp. MS136 为出发菌株，首次提出用分枝杆菌细胞裂解液生产甾药前体，并阐明了底物 I 转化为产物Ⅳ的反应机理。通过在分枝杆菌中分别过表达 *kstD*、*kstD*3 和 $kstD_M$ 基因提高 KSTD 的活性，并优化缓冲液 pH，从而提高甾药前体Ⅳ的转化率，为将来的工业化生产提供理论依据。

图 1 I 转化为Ⅳ的反应机制

Fig. 1 The reaction mechanism of Ⅰ to Ⅳ

1材料与方法

1.1 材料

1.1.1菌株、质粒和培养基

本文涉及的所有质粒和菌株信息详见表1。质粒pMV261购自Biosci公司， 基因*kstD*，*kstD*3和$kstD_M$由Genewiz公司合成。

分枝杆菌液体培养基：甘油10 g/L、酵母提取物10 g/L、磷酸氢二铵1.5 g/L、磷酸氢二钾0.5 g/L、磷酸二氢钾0.5 g/L、吐温80 2.5 g/L、无水硫酸镁10 g/L、硫酸亚铁0.5 g/L、硫酸锌0.2 g/L，pH 7.2-7.3；固体培养基添加15 g/L琼脂粉。

表 1 实验中涉及的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this research

Strain or plasmid	Relevant genotype and description	Reference or source
Strains		
Mycobacterium sp. MS136	*Mycobacterium* sp. CGMCC 13532	This work
E.coli BL21(DE3)	used to express foreign protein	This work
Plasmids		
pUC57-*kstD*	Amp^r , carries *kstD*	This work
pUC57- *kstD*3	Amp^r , carries *kstD*3	This work
pUC57-*kstD*$_M$	Amp^r , carries *kstD*$_M$	This work
pMV261	Kan^r, Shuttle vector of *mycobacterium* and *E. coli*, carrying the heat shock hsp60 promoter	Telentiet al. (1997)
pMV261-*kstD*	Kan^r, carries *kstD*	This work
pMV261-*kstD*3	Kan^r, carries *kstD*3	This work
pMV261-*kstD*$_M$	Kan^r, carries *kstD*$_M$	This work
pET-28a	Kan^r , *E. coli* expression vector	Novagen
pET-*kstD*	Kan^r, carries *kstD*	This work
pET-*kstD*3	Kan^r, carries *kstD*3	This work
pET-*kstD*$_M$	Kan^r, carries *kstD*$_M$	This work

1. 1. 2试剂及仪器

T4 DNA 连接酶、限制酶*Bam*HI和*Hin*dIII购自Fermentas公司；Gibson组装预混液购于NEB公司；质粒小提试剂盒、普通DNA产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根公司； Ⅰ、Ⅱ和Ⅳ均购自上海博顿生物化工有限公司；氢化可的松、PMS（吩嗪硫酸甲酯）购于Solarbio公司。所用仪器：超声破碎仪（SCIENTZ)、高效液相色谱仪（Waters)、电转仪（Ependorf)。

1.1.3 引物用于 PCR 的引物见表 2。

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primers used for amplification

Primers	Sequences (5’-3’)
kstD-F	CCCGATCCGGAGGAATCACGGATCCATGACCACCGAAACCGCTGG
kstD-R	AACTACGTCGACATCGATAAGCTTTTAAGACGGCTGAGCAGATTC
kstD3-F	CCCGATCCGGAGGAATCACGGATCCATGTCTGACTCTGACCTGGAATTC
kstD3-R	TAACTACGTCGACATCGATAAGCTTTTATTCAGCAGAAGACTGGGTAGC
kstD$_M$-F	CCCGATCCGGAGGAATCACGGATCCATGTTCTACATGACCGCTCAGG
kstD$_M$-R	TAACTACGTCGACATCGATAAGCTTTTAAGCTTTACCAGCCAGGTGC
pMV261-F	CAGCGAGGACAACTTGAGCCGT

pMV261-R	ACATCAGAGATTTTGAGACACA
T7	ACATCCACTTTGCCTTTCTC
T7ter	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.2方法

1.2.1全细胞转化底物Ⅰ

培养 *Mycobacterium* sp. MS136 的方法如下：将 *Mycobacterium* sp. MS136 细胞接种于 5 ml 液体培养基中，30 ℃过夜培养。转接到另一装有 50 ml 液体培养基的 250 ml 锥形瓶中，30 ℃、200 r/min 培养 5 h（OD_{600} 达到 0.5-0.6），添加终浓度为 0.1 g/L 的诱导剂氢化可的松，30 ℃ 200 r/min 培养 24 h。10000 rpm 离心 5 min 收集菌体，用 pH 7.0 的 0.2M 磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤两次后重悬菌体至 OD_{600} 达到 2.0。取 50 ml 细胞悬浮液转入 250ml 锥形瓶中，加入 1 g/L Ⅰ、2.5 mM PMS 和 7 %乙醇，30 ℃、200 r/min 反应。

1.2.2 细胞裂解液转化底物Ⅰ

取 40 ml*Mycobacterium* sp. MS136 细胞悬浮液进行超声破碎，超声功率 500 W，破碎时间 5 s，间歇时间 5 s，总共需要 20 min，全程冰上操作。如果破碎后的细胞出现混浊现象，应重复超声操作。将破碎后的细胞裂解液转入 250ml 锥形瓶中，加入 1 g/L Ⅰ、2.5 mM PMS 和 7 %乙醇，30 ℃、200 r/min 反应。

1.2.3 KSTD 氨基酸序列分析

利用 DNAman 软件对已获的 $C_{1,2}$ 位脱氢酶氨基酸序列新金分枝杆菌 *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795（kstD Genbank ID：GQ476982、kstD3 Genbank ID：KF772210）和新金分枝杆菌 *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01（$kstD_M$ Genbank ID：GQ228843）与耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis*（MSMEG5941）的 $C_{1,2}$ 位脱氢酶氨基酸序列进行多序列对比分析。

1.2.4 重组质粒的构建

如图 2 所示，以 pMV261-*kstD* 的构建为例，以合成的质粒 pUC57-*kstD* 为模板，按照表 2 的引物扩增各目的基因片段并纯化回收。所得 PCR 产物 *kstD* 基因片段分别与线性化的 pMV261 载体（*Hin*dIII 和 *Bam*HI 限制性酶切）通过 Gibson assembly 无缝连接法组装在一起，从而构建重组质粒 pMV261-*kstD*，使基因片段置于 hsp60 启动子的控制下。重组质粒 pMV261-*kstD*3 和 pMV261-$kstD_M$ 的构建方法相同。

将质粒 pET-28a 及上述 PCR 产物 *kstD*、*kstD*3 和 $kstD_M$ 基因分别进行 *Hin*dIII 和 *Bam*HI 双酶切，胶回收相应基因片段和同时双酶切的 pET-28a 质粒，按照比例连接获得重组质粒 pET-*kstD*、pET-*kstD*3 和 pET-$kstD_M$。

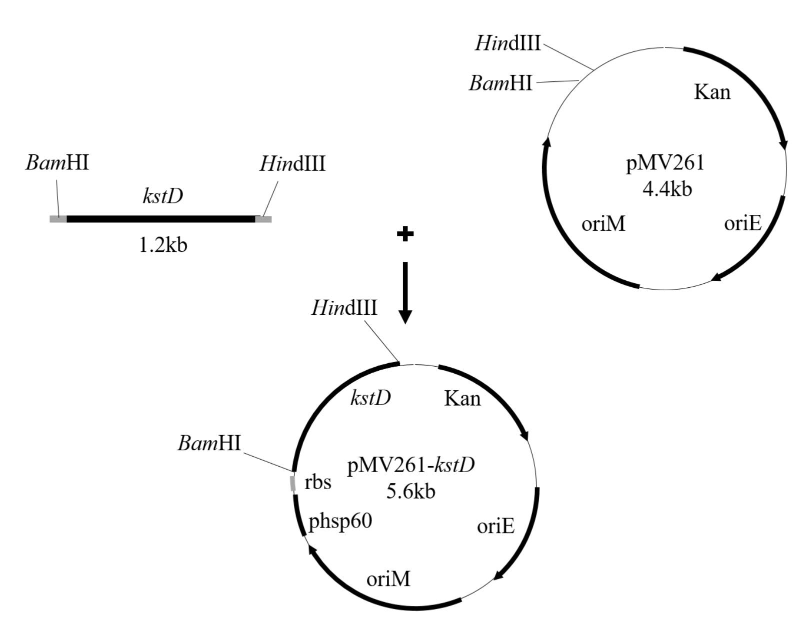


图 2 重组质粒 pMV261-*kstD* 的构建

Fig. 2 The construction of the recombinant plasmidpMV261-*kstD*

1.2.5 重组质粒的转化

将菌体用无菌水洗 2 次，5000 r/min 离心，最终重悬于无菌水中。利用电转化法[21]将重组质粒 pMV261-*kstD*，pMV261-*kstD*3 和 pMV261-$kstD_M$ 导入宿主菌

株 *Mycobacterium* sp. MS136，电转化条件：电压 1.8 kV，电击杯孔径 1mm，电击两次；确认电击频率(4-5ms)$^{-1}$ 范围，电击处理后的感受态于冰上放置 5 min，利用终浓度为 50 μg/ml 卡那霉素抗性平板筛选转化子。

将上述获得的重组质粒 pET-*kstD*、pET-*kstD*3 和 pET-*kstD*$_M$ 转化至新鲜制备的表达宿主 BL21(DE3)感受态细胞中，并将其涂布于含有 50 μg/ml 卡那霉素抗性平板，37 ℃恒温隔夜培养。

1.2.6 样品的提取、检测与定量

反应液混匀后，迅速吸取适量，用稀释剂（乙腈∶水＝5∶5）稀释 10 倍后经 0.25μm 滤膜过滤，取滤液上紫外液相检测。色谱条件：色谱柱：BDS HYPERSIL C18 色谱柱（150 mm×4.6mm，5μm）；检测器：Waters 2489 UV/Vis；泵：Waters e2695；流动相：乙腈∶水＝3∶7；柱温：40 ℃；检测波长为 240 nm；流速 1.2 ml/min。定量方法：使用相同的色谱条件测定Ⅱ和Ⅳ标准品的标准溶液，绘制浓度-峰面积标准曲线，对Ⅱ和Ⅳ定量。用生成产物的摩尔数除以底物的摩尔数即可得生成物的转化率。

2 结果与讨论

2.1 比较全细胞转化法与细胞裂解液转化法

分别用 *Mycobacterium* sp. MS136 全细胞和细胞裂解液转化底物Ⅰ。表 3 中，利用分枝杆菌 MS136 全细胞转化 1 g/L 底物Ⅰ反应 45 h，底物Ⅰ只残余 5 %的量，对产物Ⅱ的转化率为 60.3 %，反应体系中检测不到产物Ⅳ的积累；表明分枝杆菌 MS136 菌株有可能将底物Ⅰ水解后进一步代谢，导致产物Ⅳ无法积累。而细胞裂解液转化 1 g/L 底物Ⅰ反应 45 h，底物Ⅰ残余量为 20 %，反应体系中产物Ⅳ转化率为 56.8 %。由图 3 可知，1 g/L 底物Ⅳ在细胞裂解液中反应 45 h 后，Ⅳ剩余

0.92 g/L，说明以Ⅳ为底物时，细胞裂解液不能将其进一步降解。

表 3 全细胞与细胞裂解液以Ⅰ为底物的转化情况

Table 3 Conversion result of Ⅰ by whole cell and cellular lysates

转化 45 h	全细胞转化法	细胞裂解液转化法
Ⅰ（g/L）	0.052	0.204
Ⅱ（g/L）	0.519	0.054
Ⅲ（g/L）	NT	NT
Ⅳ（g/L）	NT	0.485

NT：not tested

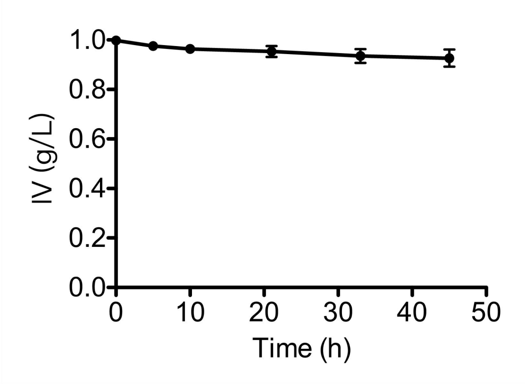


图 3 分枝杆菌细胞裂解液转化Ⅳ的产物生成曲线

Fig. 3 Time courses of the conversion Ⅳ by cellular lysates of *Mycobacterium* sp. MS136

2.2 研究分枝杆菌细胞裂解液转化底物Ⅰ的反应机制

1 g/L 底物Ⅰ在 pH 7.0 的分枝杆菌细胞裂解液中反应，分别在 2 h，5 h，10 h，21 h，33 h、45 h 和 76 h 取样，检测产物的生成情况。如图 4 所示，产物Ⅳ随时间不断增加，45 hⅣ的转化率达到最高值 56.8 %，而Ⅱ的转化率始终较低。在产物中始终未检测到Ⅲ，说明分枝杆菌细胞裂解液转化Ⅰ的反应顺序是Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ。

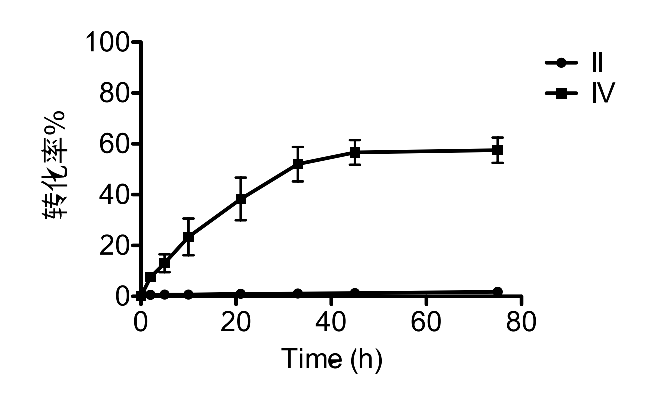


图 4 分枝杆菌细胞裂解液转化Ⅰ的产物生成曲线

Fig. 4 Time courses of the conversion Ⅰ to Ⅱ and Ⅳ by cellular lysates of *Mycobacterium* sp. MS136

1 g/L 底物Ⅰ在 pH 7.0 的 PBS 中反应，只有产物Ⅱ的生成，45 h 后，Ⅱ的转化率为 6.7 %（如图 5）。说明Ⅰ发生 C-21 脱乙酰化反应即水解反应是自发进行的，而 $C_{1,2}$ 脱氢反应是酶催化反应。

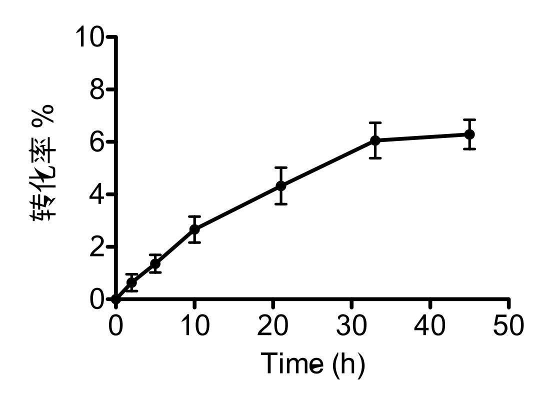


图 5 磷酸盐缓冲液转化Ⅰ的产物生成曲线

Fig. 5 Time course of the conversion Ⅰ to Ⅱ by PBS

分枝杆菌细胞裂解液分别以Ⅰ和Ⅱ为底物进行生物转化，如图 6 所示，45 hⅣ的转化率几乎相同（分别是 56.8 %和 57.3 %）。以上数据说明在分枝杆菌细胞裂解液转化Ⅰ的反应中：1）反应顺序为Ⅰ自发水解形成Ⅱ，Ⅱ经 KSTD 催化为Ⅳ；2）从Ⅱ到Ⅳ的 $C_{1,2}$ 脱氢酶催化反应是关键步骤。

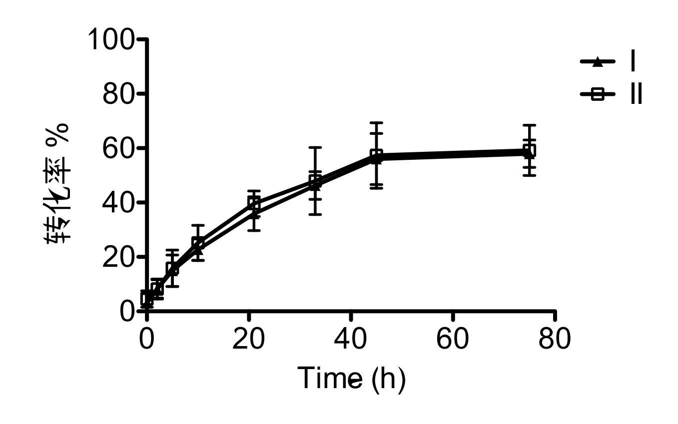


图 6 分枝杆菌细胞裂解液转化Ⅰ和Ⅱ的产物生成曲线

Fig. 6 Time courses of the conversion Ⅰ and Ⅱ to Ⅳ by cellular lysates of *Mycobacterium* sp. MS136

2.3 KSTD 氨基酸序列分析

已获的 KSTD 氨基酸序列与耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* 的 $C_{1,2}$ 位脱氢酶氨基酸序列比对分析结果如图 7 所示，MSMEG5941 和 $kstD_M$ 的氨基酸序列同源性最高，为 88 %；与 kstD3 和 kstD 的同源性较低，分别为 36 %和 12 %。kstD3 和 $kstD_M$ 的黄素腺嘌呤二核苷酸结合位点（Flavin Adenine Dinucleotide binding，简称 FAD-binding）与 Van 等[22]推测的 KSTD 的 FAD-binding 序列一致，即 GSG(G/A)(G/A)(G/A)X_{17}E。根据 KSTD 氨基酸序列比对分析结果，相比于 kstD 和 kstD3，$kstD_M$ 和 MSMEG5941 的氨基酸序列同源性最高，可能其脱氢酶活性最高。

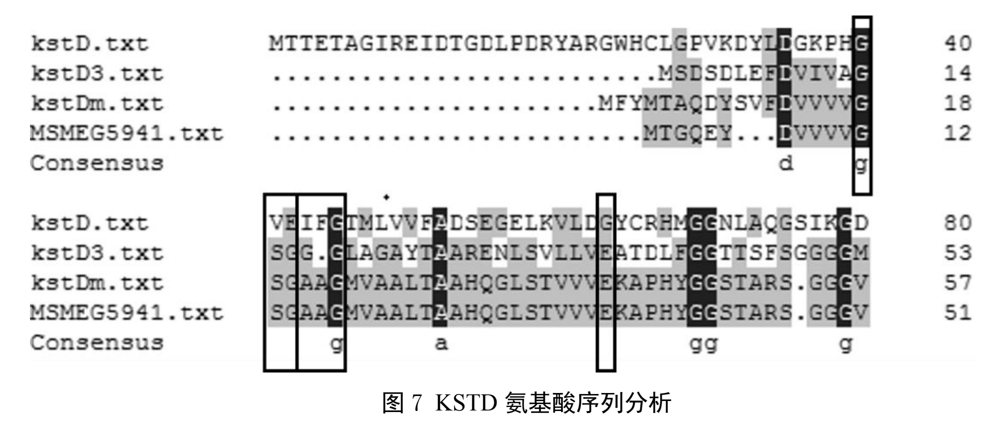


图 7 KSTD 氨基酸序列分析

Fig. 7 Amino acid sequence alignments of KSTD

2.4 重组质粒的构建与验证

分枝杆菌中 *kstD*、*kstD*3 和 *kstD*$_M$ 的基因长度分别为 1200bp、1560bp 和 1713bp，以合成的质粒为模板进行扩增 PCR，产物经 1%琼脂糖电泳检测，在 2000bp 以下可见三条明显的特异性条带（图 8），与目的片段的大小位置相符。将目的基因连接到载体 pMV261 上，转入 *E.coli* DH5α中，提取重组质粒 pMV261-*kstD*、

pMV261-*kstD*3 和 pMV261-*kstD*$_M$，采用质粒测序引物 pMV261-F 和 pMV261-R 进行 PCR 验证和测序验证，结果表明各重组质粒构建成功。通过测序引物 T7 和 T7ter 对重组质粒 pET-*kstD*、pET-*kstD*3 和 pET-*kstD*$_M$ 进行 PCR 验证和测序验证，结果表明各重组质粒构建成功。

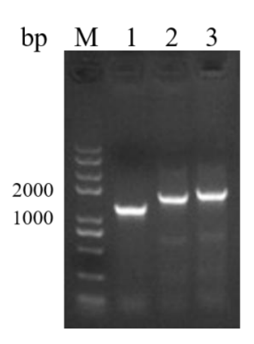


图 8 *kstD*、*kstD*3 **和** *kstD*$_M$ **的 PCR 产物**

Fig. 8 PCR productions of *kstD*、*kstD*3 and *kstD*$_M$

2.5 **分枝杆菌重组菌株的转化**

对分枝杆菌重组菌株 MS136-*kstD*，MS136-*kstD*3，MS136-*kstD*$_M$ 细胞裂解液的转化特性进行研究，考察其对 Ⅰ 的转化效率，用 HPLC 法检测产物Ⅳ的生成情况，同时以导入 pMV261 空白载体的出发菌株细胞裂解液作对照。如图 9 所示，1 g/L 底物 Ⅰ 在 pH 7.0 的分枝杆菌细胞裂解液中反应 45 h 后，重组菌株 MS136-*kstD*，MS136-*kstD*3 和 MS136-*kstD*$_M$Ⅳ的转化率分别为 60.6 %，69.5 %和 78.4 %，出发菌株Ⅳ的转化率为 56.8 %，最多提高了 38.9 %。以上数据表明过表达 kstD 基因（特别是 *kstD*$_M$）后，KSTD 的活力明显提高，加速脱氢反应，导致Ⅳ大量积累。

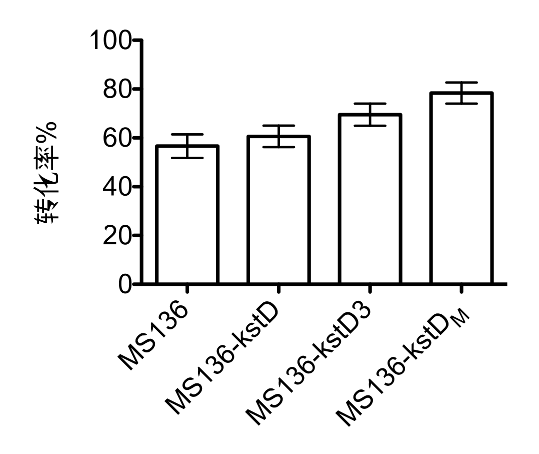


图 9 出发菌与重组菌的转化率比较图

Fig. 9 Time courses of the conversion Ⅰ to Ⅳ by cellular lysates of *Mycobacterium* sp. MS136

2.6 不同 pH 的缓冲液对产物Ⅳ转化率的影响

缓冲液的 pH 不同会影响底物Ⅰ的转化。本实验对比了重组菌株 MS136-*kstD*$_{M}$细胞裂解液 pH 值分别为 6，6.5，7，7.5，8 时Ⅳ的转化率，反应条件为底物投料量 1 g/L 反应 45 h。由图 10 可知，pH 7.5 最佳，此时Ⅳ的转化率达到 92.8 %，其原因可能是碱性条件加速水解反应，使Ⅰ更易水解为Ⅱ，再由 KSTD 酶催化为Ⅳ;也可能是 pH 7.5 时 KSTD 酶活更高，而 pH 8 的裂解液降低了 KSTD 酶活，导致Ⅳ的转化率有所下降。

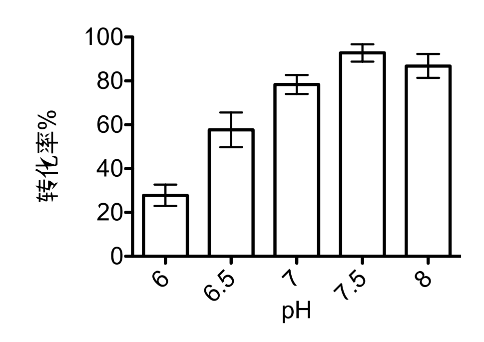


图 10 pH 对产物Ⅳ转化率的影响

Fig. 10 The effect of pH on conversion rate of Ⅳ

2.7 大肠杆菌重组菌株的转化

对大肠杆菌重组菌株 BL21(DE3)-*kstD*，BL21(DE3)-*kstD*3，BL21(DE3)-*kstD*$_{M}$

细胞裂解液的转化特性进行研究，考察其对Ⅰ的转化效率，用 HPLC 法检测产物Ⅳ的生成情况。如图 11 所示，1 g/L 底物Ⅰ在 pH 7.5 的大肠杆菌细胞裂解液中反应 45 h 后，重组菌株 BL21(DE3)-*kstD*，BL21(DE3)-*kstD*3，BL21(DE3)-$kstD_M$Ⅳ的转化率分别为48.7 %，71.6 %和 79.5 %。相比于分枝杆菌重组菌株MS136-$kstD_M$（92.8 %），BL21(DE3)-$kstD_M$Ⅳ的转化率较低，其原因可能是分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. MS136 自身含有编码 $C_{1,2}$ 位脱氢酶的基因，且能翻译出有活性的脱氢酶，而大肠杆菌 BL21(DE3)不能。

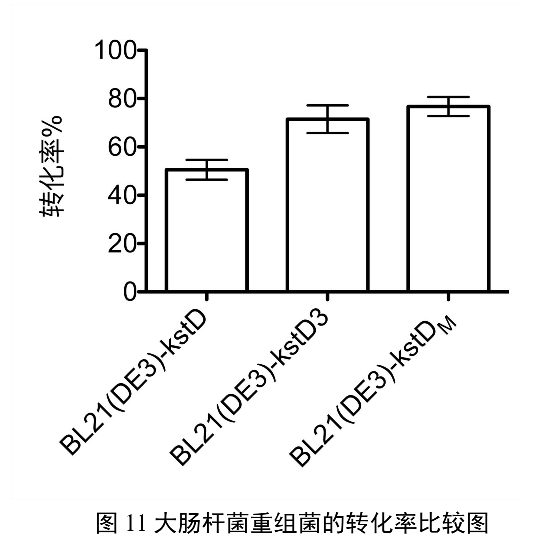


图 11 大肠杆菌重组菌的转化率比较图

Fig. 11 Time courses of the conversion Ⅰ to Ⅳ by cellular lysates of *E.coli* BL21(DE3)

3 结论

产物Ⅳ是用于生产 9-氟甾体激素（如地塞米松，倍他米松，曲安西龙等）的关键前体[10-11]。本实验以 *Mycobacterium* sp. MS136 为出发菌株，通过细胞裂解液转化Ⅰ生产Ⅳ，并阐明了Ⅰ转化为Ⅳ的反应机理，即Ⅰ先自发水解为中间体Ⅱ，Ⅱ经 KSTD 催化发生 $C_{1,2}$ 位脱氢反应转化为产物Ⅳ。为提高产物Ⅳ的转化率，在

分枝杆菌中分别过表达编码 KSTD 的关键基因：*kstD*、*kstD*3 和 $kstD_M$， 并优化缓冲液 pH，结果表明 1 g/L 底物Ⅰ在 pH 7.5 的重组菌株 MS136-$kstD_M$ 细胞裂解液中反应 45 h，产物Ⅳ的转化率为 92.8 %，比优化前提高了 63.4 %。本研究首次提出用分枝杆菌细胞裂解液生产甾药前体，为甾体激素类药物的定向转化和工业化生产提供了理论依据。

参考文献

[1]Tong W Y, Dong X. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. Recent Pat Biotechnol, 2009, 3(2): 141-153.

[2] Croxatto H B. Progestin implants. Steroids, 2000, 65(10-11): 681-685.

[3] Hughes D T, Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(2): 111-120.

[4] Bragin J, Saowakhon S, Manosroi A. A novel one-step biotransformation of cortexolone-21-acetate to hydrocortisone acetate using *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688a. Enzyme Microb Technol, 2007, 41(3):322-325.

[5] Funder J W. Minireview: aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. Endocrinology, 2010, 151(11):5098-5102.

[6] García J L, Uhía I, Galán B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. Microb Biotechnol, 2012, 5(6):679-699.

[7] Bragin E Y, Shtratnikova V Y, Dovbnya D V, et al. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium spp.* strains. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 138(10):41-53.

[8] Xie R, Shen Y, Qin N, et al. Genetic differences in ksdD influence on the ADD/AD ratio of *Mycobacterium neoaurum*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2015, 42(4):507-513.

[9] Cruz A, Angelova B, Fernandes P, et al. Study of key operational parameters for the side-chain cleavage of sitosterol by free mycobacterial cells in bis-(2-ethylhexyl) phthalate. Biocatal Biotransform, 2004, 22(3):189-194.

[10] Fokina V V, Sukhodol'skaya G V, Gulevskaya S A, et al. The 1(2)-dehydrogenation of steroid substrates by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. Microbiology, 2003, 72(1):24-29.

[11] Fokina V V, Donova M V. 21-Acetoxy-pregna-4(5),9(11),16(17)-triene-21-ol-3,20-dione conversion by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 87(4-5):319-325.

[12] Donova M V. Transformation of steroids by actinobacteria: a review. Applied Biochemistry and Microbiology, 2007, 43(1):5-18.

[13] Donova M V, Egorova O V. Microbial steroid transformations: Current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94(6):1423-1447.

[14] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments. Enzyme Microb Technol, 2003, 32(6):688-705.

[15] Yao K, Xu L Q, Wang F Q, et al. Characterization and engineering of 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase and

3-ketosteroid-9α-hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 to produce 9α-hydroxy-4-androstene-3, 17-dione through the catabolism of sterols. Metabolic Engineering, 2014, 24:181-191.

[16] Wei W, Wang F Q, Fan S Y, et al. Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01: biotransformation of soybean phytosterols to 4-androstene-3, 17-dione or 1, 4-androstadiene-3, 17-dione. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(13):4578-4582.

[17] Zhang W Q, Shao M L, Rao Z M, et al. Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione toandrost-1,4-diene-3,17-dione by recombinant *Bacillus subtilis*expressing ksdd gene encoding 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenasefrom *Mycobacterium neoaurum* JC-12. J Steroid Biochem MolBiol, 2013, 135(1):36-42.

[18] Li Y, Lu F, Sun T, et al. Expression of ksdD gene encoding 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* in *Bacillus subtilis*. Lett Appl Microbiol, 2007, 44(5):563-568.

[19]Malaviya A, Gomes J. Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. Bioresource Technology, 2008, 99(15):6725-6737.

[20] Shao M, Zhang X, Rao Z, et al. Enhanced production of androst-1,4-diene- 3,17-dione by *Mycobacterium neoaurum* JC- 12 using three-stage fermentation strategy. PLoS One, 2015, 10(9):e0137658.

[21] Flett F, Mersinias V, Smith C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. FEMS Microbiol Lett, 1997, 155(2):223-229.

[22] Van D G R, Hessels G I, Van G R, et al. Targeted disruption of the kstD geneencoding 3-ketosteroid-Δ^1-dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis*SQ1. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5): 2029–2036.